

# VU Research Portal

## New Approaches to the Laboratory Diagnosis of Legionnaires' Disease

Diederer, B.M.W.

2007

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Diederer, B. M. W. (2007). *New Approaches to the Laboratory Diagnosis of Legionnaires' Disease*. [PhD-Thesis – Research external, graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# SAMENVATTING NEW APPROACHES FOR THE LABORATORY DIAGNOSIS OF LEGIONNAIRES' DISEASE

Bram Marcel Will Diederer

Het doel van een diagnostische test in de klinische microbiologie is het tijdig aantonen van een verwekker, zodat een gerichte (antibiotische) therapie kan worden gestart. De ideale test voor het aantonen van *Legionella* speciës bestaat echter niet. Hoewel de laboratoriumdiagnostiek sinds de eerste beschrijving van legionellose in 1976 sterk is verbeterd, is geen enkele test in staat ziekte veroorzaakt door alle legionellasoorten aan te tonen met een optimale mate van snelheid, sensitiviteit en specificiteit.

Serologisch onderzoek (het aantonen van antilichamen gericht tegen *L. pneumophila*), was eens de meest gebruikte diagnostiek. Bij het doormaken van legionellose kan seroconversie echter zeer langzaam verlopen [1]. Dit heeft er mede voor gezorgd dat het gebruik ervan de laatste jaren is afgenomen [2]. Binnen 3 weken treedt in de meeste gevallen een significante titerstijging op, maar soms duurt het 3 maanden vooraleer een titerstijging wordt waargenomen [1,3]. Indirecte immunofluorescentietests (IFA) en enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) zijn op dit moment de meest gebruikte technieken. Deze laatste lijkt gevoeliger dan de IFA [3,5,6,8]. Ook kan een ELISA makkelijker geautomatiseerd worden en is het aflezen van de uitslag minder subjectief dan bij een IFA. Deze tests, die commercieel verkrijgbaar zijn, worden tegenwoordig veel gebruikt. Er zijn echter weinig studies verricht die de gevoeligheid en specificiteit van deze tests hebben bepaald. In **hoofdstuk 2** beschrijven we de evaluatie van een aantal commercieel verkrijgbare IFA's en ELISA's (Vircell, S.L., Santa Fé, Granada, Spanje). Voor het bepalen van de sensitiviteit en specificiteit werd gebruik gemaakt van een groep van 65 patiënten met legionellose en 29 patiënten met respiratoire infecties anders dan legionellose. Gebruikmakend van de testresultaten werden tevens de overeenkomst, sensitiviteit en specificiteit van de Vircell assays vergeleken ten opzichte van een andere test, een veelgebruikte ELISA (Serion *classic* ELISA). Monsters werden met IFA en ELISA getest op de aanwezigheid van *L. pneumophila* serogroep 1 IgM- en IgG-antilichamen en met een gecombineerde IgM-plus-IgG ELISA op *L. pneumophila* serogroep 1 tot en met 6, volgens de instructies verstrekt door de fabrikant. De sensitiviteit en specificiteit bedroegen respectievelijk 75% en 97% voor IFA IgM, 65% en 88% voor IFA IgG, 92% en 100% voor ELISA IgM, 43% en 97% voor ELISA IgG en 91% en 100% voor de gecombineerde IgM-plus-IgG ELISA. Als de te evalueren tests, de Vircell assays, vergeleken worden met een toegewezen serologische standaard, de Serion ELISA, worden een overeenkomst, sensitiviteit en specificiteit gevonden van respectievelijk 79%, 66% en 89% voor IFA IgM, 75%, 59% en 84% voor IFA IgG, 90%, 97%, en 83% voor IgM ELISA, 82%, 55% en 96% voor Vircell IgG ELISA, en 94%, 96% en 92% voor gecombineerde IgM-plus-IgG ELISA.

Het feit dat we een even hoge of zelfs hogere sensitiviteit vonden bij de ELISA's ten opzichte van de IFA's was niet echt verrassend; dit werd al in eerdere publicaties gemeld [3,5,6]. Een hoge gevoeligheid is natuurlijk belangrijk, aangezien je met een enkele test zoveel mogelijk patiënten met legionellose wilt diagnosticeren. De belangrijkste testeigenschap voor een relatief zeldzame ziekte is echter de specificiteit [3,7]. Bij bijvoorbeeld een prevalentie van 5% en een gevoeligheid en specificiteit van 97% zijn nog ongeveer vier op tien positieve tests fout-positief. Het gevaar voor fout-positieve uitslagen is daarom waarschijnlijk te hoog bij beide (IgM en IgG) immunofluorescentietests. De Vircell

IgM ELISA en IgM-plus-IgG ELISA lijken wel bruikbaar, gezien de hoge gevoeligheid en specificiteit.

Een welomschreven populatie met en zonder legionellose werd onderzocht, waarvan de overgrote meerderheid een infectie met *L. pneumophila* serogroep 1 had, waardoor de waarde van de tests voor infecties met andere speciës en serogroepen onbekend is. Een ander nadeel is het gebruik van een relatief kleine controlegroep met luchtweginfecties anders dan legionellose. Deze studie benadrukt echter het belang van een onafhankelijke evaluatie voor nieuwe diagnostische tests.

Hoewel vele beschikbare serologische tests een hoge gevoeligheid en specificiteit hebben, vormt de trage antistofrespons een ernstige belemmering voor een snelle diagnose [1,3,8,9]. Hierdoor is het belang ervan voor de patiëntenzorg in de acute fase bijzonder gering.

In **hoofdstuk 3** wordt een patiënt beschreven die waarschijnlijk een infectie met *L. pneumophila* had, maar bij wie de diagnose werd bemoeilijkt door de aanwezigheid van kruisreagerende antistoffen tegen *Coxiella burnetii*, de verwekker van Q-koorts. In het acute stadium van de ziekte was de serologie voor legionellose weliswaar negatief in ELISA, maar de gevonden IgM-waarde was hoger dan men zou verwachten op basis van gegevens uit een normale, gezonde populatie [10], en seroconversie volgde. Dus gelijktijdige seroconversie voor Q-koorts en legionellose. Omdat legionellose en Q-koorts een vergelijkbaar klinisch beeld kunnen hebben, is het belangrijk een correcte diagnose te stellen. De behandeling van beide beelden is namelijk verschillend.

Vanaf het begin van de jaren 80 van de vorige eeuw zijn verschillende tests beschikbaar voor het aantonen van *L. pneumophila* serogroep 1-antigeen in de urine [11,12,13]. De sensitiviteit van de test ligt rond de 80% (hoe ernstiger de ziekte, des te sensitiever de test), de specificiteit is 99-100%. Met deze test, die in Nederland thans tot de routinediagnostiek behoort, is het mogelijk om vroeg in de ziekte de diagnose te stellen en dus snel adequate antibiotische therapie te starten, in tegenstelling tot bijvoorbeeld met serologie en kweek. De urineantigeentest is nu de meest gebruikte test in Nederland en Europa [2,14]. In deel 2 wordt de evaluatie van een aantal nieuwe, commerciële immunochromatografische urineantigeentests beschreven. Voor het bepalen van de sensitiviteit en specificiteit werd gebruik gemaakt van ingevroren, ongeconcentreerde urine, afgenomen van een groep patiënten met legionellose en een groep patiënten met respiratoire infecties anders dan legionellose. De sensitiviteit en specificiteit bedroegen respectievelijk 71% en 97% voor de Rapid U-test (Diamondial, Sees, Frankrijk); 32% en 99% voor de SD Bioline-test (Standard Diagnostics, Inc., Kyonggi-do, Korea); en 92% en 100% voor de Binax NOW-test (**hoofdstuk 4**). De gevoeligheid nam toe na verlenging van de incubatietijd naar een uur: 81% (59/73) ( $p = 0,25$ ) en 95% (69/73) ( $p = 0,75$ ), voor respectievelijk de Rapid U-test en de Binax NOW-test. Het verlengen van de incubatietijd had geen invloed op de specificiteit van zowel de Rapid U- als de Binax NOW-test. De fabrikant paste de Rapid U-urineantigeentest aan, en wij hebben deze aangepaste test geëvalueerd (Rapid U Plus-test), beschreven in **hoofdstuk 5**. De sensitiviteit en specificiteit bedroegen respectievelijk 92% en 96%. De gevoeligheid nam toe naar 93% na verlenging van de incubatietijd naar een uur, maar de specificiteit daalde naar 80%. Het verlengen van de incubatietijd had opnieuw geen invloed op de specificiteit van de Binax NOW-test. Het blind accepteren van getallen die in de bijsluiter staan kan tot verkeerde conclusies en keuzes leiden bij diegene die de test wil gaan gebruiken. Hoewel de SD Bioline-test de slechtste resultaten liet zien, werden vals-positieve resultaten bij alle (Rapid U en SD Bioline) nieuwe urineantigeentests gezien, met lage positief voorspellende waarden als gevolg. Gezien het belang van een juiste diagnose van deze (aangifteplichtige) ziekte lijkt het

onverstandig om op deze tests te vertrouwen. De Binax NOW-test presteerde optimaal en kan dus wel gebruikt worden voor een betrouwbare sneldiagnostiek.

De sensitiviteit en specificiteit van een andere nieuwe test, de SAS Legionella Test (SA Scientific, San Antonio, Texas, VS), bedroegen respectievelijk 83% en 99%, en de gevoeligheid nam significant toe naar 97% na het verlengen van de incubatietijd (**hoofdstuk 6**). Omdat het verlengen van de incubatietijd geen invloed heeft op de specificiteit van de SAS Legionella Test, raden wij aan een langere incubatietijd te gebruiken dan de 10 minuten die nu door de fabrikant wordt aanbevolen.

De diagnose pneumokokkenpneumonie bij een patiënt met een community-acquired pneumonie (CAP) wordt bevestigd door isolatie van het organisme in het bloed of sputum. Sputum is echter frequent niet te verkrijgen (patiënt hoest niet op), of het onderzoek is minder betrouwbaar door voorafgaand antibioticagebruik. Bloedkweken hebben een zeer hoge specificiteit, maar hebben een zeer lage (<30%) sensitiviteit. Er is duidelijk behoefte aan nieuwe, snelle tests voor de diagnose pneumokokkenpneumonie. De pneumokokkenantigeentest (Binax, Inc., Portland, Maine, VS) is een immunochromatografische membraantest die het C-polysaccharide celwandantigeen van de pneumokok in urine kan detecteren. De test kan eenvoudig en snel (<15 minuten) worden uitgevoerd. In **hoofdstuk 7** wordt de evaluatie van deze test beschreven. Voor het bepalen van de sensitiviteit en specificiteit werd gebruik gemaakt van ingevroren, ongeconcentreerde urine, afgenomen van een groep patiënten met pneumokokkenpneumonie (n=58), en patiënten met respiratoire infecties anders dan pneumokokken (n=136), met name patiënten met legionellose (n=98). De sensitiviteit en specificiteit bedroegen respectievelijk 69% (95% betrouwbaarheidsinterval [95% BI] 58 tot 78%) en 98% (95% BI 93 tot 99%). Opvallend was dat in de groep patiënten met een legionellose geen enkel vals-positief resultaat werd gevonden. Bij een legionellose lijkt een vals-positieve pneumokokkenantigeentest dus niet voor te komen. Het antigeen werd vaker aangetoond bij patiënten met een bacteriëmie (38/52 [73%]) dan zonder bacteriëmie (2/6 [70%]) ( $p = 0,07$ ). Het verrichten van een pneumokokkenantigeentest kan bijdragen tot snellere determinatie van de oorzakelijke verwekker en mogelijk dus tot vroegtijdige stroomlijning van de initiële therapie. Het is een veelbelovende test, maar waarschijnlijk nog onvoldoende gevalideerd om het gebruik als besliscriterium voor te stellen bij patiënten met een ernstige CAP. Toekomstig onderzoek zou zich hierop moeten richten.

De gouden standaard voor het stellen van de diagnose legionellose is de kweek van het micro-organisme uit patiëntenmateriaal. Dit lukt echter niet altijd, aangezien minder dan de helft van de patiënten sputum opgeeft. De gevoeligheid varieert (sensitiviteit van 10% tot 80%), en een positief resultaat is op zijn vroegst na drie dagen beschikbaar [3,19]. PCR heeft als voordeel dat alle serogroepen van *L. pneumophila* en andere *Legionella* spp. relatief snel kunnen worden aangetoond. Zoals ook geldt voor kweek is het echter een nadeel dat het materiaal dat voor de PCR noodzakelijk is (bronchoalveolaire lavage, sputum of pleuravocht) niet altijd wordt verkregen. Het gebruik van PCR op makkelijker verkrijgbaar patiëntenmateriaal, zoals urine of bloed, zou een groot voordeel kunnen opleveren bij legionellosepatiënten. In **hoofdstuk 8** worden twee patiënten met legionellose beschreven, bij wie de diagnose mede werd gesteld door de aanwezigheid van *L. pneumophila*-DNA in serum met behulp van real-time PCR. De patiënten werden kwantitatief vervolgd in de tijd. De gevonden resultaten correleerden met de klinische bevindingen en de gevonden CRP-waarden. De kwantitatieve aanwezigheid van *L. pneumophila*-DNA in serum is een weerspiegeling van de hoeveelheid DNA in het bloed, en het is wellicht mogelijk om hiermee de klinische respons op antibiotische therapie van een individuele patiënt te vervolgen. Gezien de hoge kosten van PCR, het gebrek aan validatie en de aanwezigheid van een simpel

alternatief (CRP [23]), raden wij deze techniek vooralsnog niet aan als marker voor de klinische respons bij patiënten met legionellose.

PCR biedt theoretisch de mogelijkheid om snel en betrouwbaar alle *Legionella* spp. te diagnosticeren in een patiëntenmonster dat makkelijk verkrijgbaar is. Het doel van de studie beschreven in **hoofdstuk 9** was om de sensitiviteit en specificiteit te testen van detectie van *Legionella*-specifiek DNA in serum. Voor het aantonen van *Legionella* werden drie verschillende assays gebruikt met targets op genen coderend voor het 5S en 16S rRNA-gen, en het *mip*-gen. In totaal werden 68 patiënten met bewezen legionellose (151 monsters) geïncubeerd: bij 54% van de patiënten was de test positief in 5S rRNA PCR, bij 53% in *mip*-gen PCR, en bij 31% in 16S rRNA PCR in het eerst beschikbare serum. Bij de meerderheid (81%) van de PCR positieve patiënten voor wie zowel een acuut als convalescent serum beschikbaar was, was alleen het eerste serummonster positief. Er werd een significant verband aangetoond tussen de hoogte van de Ct-waarde (gemeten in 5S rRNA PCR, n=49) en de CRP ( $r = -0,63$ , Pearson correlation coefficient,  $p < 0,0001$ ). Met andere woorden, hoe hoger het CRP, hoe lager de Ct-waarde en hoe hoger dus de hoeveelheid DNA gemeten in het bloed.

De urineantigeentest is minder gevoelig bij patiënten met een mild ziektebeeld dan bij patiënten die ernstig ziek zijn, en wij denken dat hetzelfde zou kunnen gelden voor de detectie van *Legionella*-DNA in serum. Begin 1999 trad onder bezoekers en deelnemers aan de tuinbouwtentoonstelling in Bovenkarspel een omvangrijke legionellose-epidemie op. In **hoofdstuk 9.2** werd de relatie tussen de gevoeligheid van 5S rRNA PCR en de ernst van ziekte onderzocht met sera afkomstig van deze Bovenkarspelepidemie. Patiënten werden in twee groepen verdeeld: categorie 1 (milde en matig ernstige pneumonie) en categorie 2 (ernstige pneumonie). De sensitiviteit bedroeg 49% (19/39; 95% BI 34-64 %) en 37 % (7/19; 95% BI 19-59 %) voor patiënten uit respectievelijk categorie 1 en 2, in het eerst beschikbare serummonster. Een groot nadeel van deze studie is dat de sera herhaaldelijk ontdooid zijn. Aangezien DNA chemisch instabiel is en relatief snel vervalst, zal dit de resultaten negatief beïnvloed hebben.

Onze bevindingen laten zien dat detectie van *Legionella*-specifiek DNA een waardevolle aanvulling zou kunnen zijn voor de diagnostiek van legionellose, maar dit zou in een prospectieve onderzoeksopzet moeten worden bevestigd.

Tot heden zijn 50 verschillende *Legionella* spp. beschreven, waarvan ongeveer de helft is geduid als pathogeen voor de mens. Infectie door *Legionella non-pneumophila* spp. in een immuuncompetente gastheer is in Nederland zeer zeldzaam. In **hoofdstuk 10** beschrijven wij een patiënt met een ernstige CAP, met een negatieve uitslag van de antigeentest en *Legionella*-kweek, die geïncubeerd was met *L. longbeachae*. De diagnose werd uiteindelijk gesteld op basis van PCR-onderzoek en sequentieanalyse. Hoewel in Nederland *L. pneumophila* serogroep 1 in meer dan 95% van de gevallen de verwekker van legionellose is, toont deze casus dat deze diagnose niet zomaar verworpen mag worden op basis van een negatieve urineantigeentest en kweek. Maar al te vaak zal het diagnostisch proces stoppen bij een negatieve uitslag van de urineantigeentest. Bij patiënten met een ernstige pneumonie met onbekende verwekker, alsmede bij patiënten met klinische aanwijzingen voor een *Legionella*-pneumonie en een negatieve uitkomst van de urineantigeentest, moet de diagnostiek uitgebreid worden met kweek en *Legionella*-PCR op respiratoir materiaal.

Klassiek worden kweekmethoden gebruikt om *Legionella* spp. aan te tonen in water, in Nederland volgens de zogenaamde NEN-norm 6265. De sensitiviteit van deze methode is echter niet optimaal en lijkt minder geschikt te zijn voor *Legionella non-pneumophila* spp. Het doel van de studie beschreven in **hoofdstuk 11** was om een inventarisatie te maken van

het voorkomen van *Legionella* spp. in Nederlands drinkwater. Watermonsters werden afgenomen op diverse locaties in Nederland en onderzocht op de aanwezigheid van *Legionella* spp. met behulp van kweek, PCR en sekwentieanalyse. In totaal werden 357 drinkwatermonsters onderzocht. De kweek was slechts 8 maal positief (2%); twee maal voor *L. pneumophila* en zes maal voor *Legionella non-pneumophila* spp. Het water was 311 maal positief (87%) met behulp van PCR, met name speciës anders dan *L. pneumophila*. Identificatie van *Legionella non-pneumophila* spp. werd gedaan door sekwentie-analyse van het geamplificeerde fragment coderend voor het 16S rRNA. De PCR-fragmenten van vrijwel alle *Legionella non-pneumophila* PCR-positieve monsters vertoonden 94-100% homologie met het genus *Legionella*. We kunnen concluderen dat bijna 90% van het onderzochte (niet-geremde) drinkwater besmet was met voornamelijk *Legionella non-pneumophila* spp. DNA. Blijkbaar is of raakt iedere leidingwaterinstallatie van enige complexiteit onvermijdelijk gekoloniseerd met *Legionella* spp. Het is nog onduidelijk wat hiervan de betekenis is voor de volksgezondheid. Hoewel in de familie *Legionellaceae* meer dan 50 soorten bekend zijn, is *Legionella pneumophila* verantwoordelijk voor meer dan 95% van de infecties. Beheersmaatregelen van een waterleidingnet hebben tot doel in te grijpen in het traject van amplificatie, disseminatie en transmissie. De nieuwe Waterleidingwet is gericht op het waarborgen van veilig drinkwater, waarbij minder dan 100 kolonievormende eenheden *Legionella* spp. per liter als norm wordt gehanteerd. Wie zich niet aan die norm houdt, kan bestuursrechtelijk worden vervolgd. In de praktijk betekent dit echter dat in vrijwel alle gevallen waarin *Legionella* spp. worden gekweekt, deze grenswaarde zal worden overschreden. Dit impliceert dat in Nederland *Legionella* spp. niet gedetecteerd mogen worden zonder dat daarop direct maatregelen volgen. Door het gebruik van PCR-technieken zouden watermonsters waarschijnlijk nog vaker als besmet worden beschouwd. In de praktijk is echter de associatie tussen het aantonen van *Legionella* spp. in watermonsters en het optreden van ziekte bij blootgestelde personen volstrekt onduidelijk. Een uniforme benadering waarbij eigenaren van collectieve waterleidinginstallaties aan de meest strenge eisen moeten voldoen, mag daarom ter discussie worden gesteld: de eisen bieden geen garantie voor volstrekte veiligheid en zijn bovendien buitengewoon kostbaar en ingrijpend.

Acute respiratoire infecties (ARI), variërend van met name milde klachten van de bovenste luchtwegen tot soms ook ernstiger beelden zoals pneumonie, komen vaak voor. De meeste infecties worden veroorzaakt door virussen, met name rhinovirus, influenzavirus en het respiratoir syncytieel virus [31,32,33]. Bij 30 tot 40% van de gevallen wordt echter geen verwekker gevonden. Lieberman *et al.* vonden in een tweetal prospectieve studies bij volwassenen met ARI (eerste- en tweedelijnspatiënten) bij 12% van de gevallen serologische aanwijzingen voor een infectie met *Legionella* spp. [34,35]. De diagnose werd gesteld met behulp van een in-house IFA.

In Nederland registreren de huisartsen van het NIVEL-peilstationnetwerk alle patiënten die hen consulteren voor onder andere influenza-achtige ziektebeelden (IAZ). Omdat op basis van klinische symptomen niet duidelijk is welk pathogeen de ziekte veroorzaakt, werd de ARIEL-studie (acute respiratoire infecties eerste lijn) verricht: een case-controlestudie naar ARI bij huisartspatiënten, een samenwerking tussen het RIVM, NIVEL en het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Tilburg. Een ARI-ziektebeeld is gedefinieerd als een acute infectieuze aandoening betreffende de bovenste en/of onderste luchtwegen, waarbij ten minste 1 van de volgende symptomen aanwezig is: hoesten, neusverkouden, keelpijn. Acuut is daarbij gedefinieerd als een prodromaal stadium van maximaal 4 dagen. Peilstationartsen namen een neus/keelwat af bij een aselect deel van hun patiënten met een IAZ of een ziektebeeld van een andere ARI. Voor *Legionella* spp. is niet goed bekend hoe vaak ze voorkomen bij patiënten met ARI in Nederland. Wij wilden graag

weten of en hoe vaak *Legionella* spp. voorkomen bij patiënten met ARI, vergeleken met patiënten zonder luchtwegklachten (**hoofdstuk 12**). Aangezien *Legionella*-PCR gevoeliger lijkt dan de kweek, kan daarmee naar ons idee het best een schatting worden gemaakt van de aanwezigheid van deze bacterie bij zowel symptomatische als asymptomatische patiënten. De primers en probes die gebruikt werden, grijpen aan op een fragment van het gen dat codeert voor het 16S rRNA-eiwit. In totaal werden 430 monsters, afkomstig van 230 cases en 200 controles, onderzocht. *Legionella*-DNA werd in geen enkel patiëntenmonster aangetoond. Onze bevindingen laten zien dat *Legionella* spp. zeer waarschijnlijk geen rol van betekenis spelen in de etiologie van ARI in de eerste lijn. Tevens hebben we laten zien dat asymptomatisch dragerschap zeer waarschijnlijk niet voorkomt [36]. De discrepantie van onze resultaten met die van Lieberman *et al.* kan natuurlijk berusten op geografische verschillen in het voorkomen van *Legionella* spp.-infecties, seizoensinvloeden, alsmede op verschillen in patiëntkarakteristieken. Naar ons idee berust het gevonden verschil echter op de verschillen in gebruikte diagnostiek om infectie met *Legionella* spp. aan te tonen. Zoals eerder aangegeven is de specificiteit een belangrijke testeigenschap voor een relatief zeldzame ziekte. Bij een theoretische *Legionella* spp.-prevalentie van 2% bij patiënten met ARI, en een gevoeligheid en specificiteit van een IFA van 99%, zijn nog ongeveer drie op tien positieve tests fout-positief. Het gevaar voor fout-positieve resultaten is nog veel hoger als je een enkel serum 41 keer test middels IFA met glaasjes gecoat met de verschillende serogroepen van *L. pneumophila* en verschillende *Legionella* spp. [34,35].

Chronisch obstructieve longziekte (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) is een chronische vernauwing van de luchtwegen die de ademhaling beperkt, en wordt gekenmerkt door klachten van kortademigheid, hoesten en/of het opgeven van slijm. Een COPD-exacerbatie (AECOPD) wordt gekenmerkt door een forse toename van klachten en gaat vaak samen met een (virale) luchtweginfectie. Op basis van verschillende serologische studies wordt gesuggereerd dat atypische luchtwegpathogenen (*Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella* spp. en *Mycoplasma pneumoniae*) geassocieerd zijn met AECOPD [40-50]. In **hoofdstuk 13** beschrijven wij een onderzoek onder COPD-patiënten bij wie de aanwezigheid van deze atypische luchtwegpathogenen werd onderzocht. De aanwezigheid van DNA in sputa werd met real-time PCR onderzocht. In totaal werden 248 sputa onderzocht, 122 van patiënten die klinisch stabiel waren, en 126 afkomstig van patiënten met een acute exacerbatie. *C. pneumoniae* en *M. pneumoniae* werden in geen enkel monster aangetoond. *Legionella* spp. werd tweemaal gedetecteerd: eenmaal uit een monster afkomstig van een stabiele patiënt, en eenmaal uit een monster van een patiënt met een exacerbatie. De bevindingen tonen geen associatie tussen atypische verwekkers en AECOPD. Methodologische factoren kunnen de resultaten van sero-epidemiologisch onderzoek beïnvloeden, en als gevolg daarvan kan in andere studies een associatie gevonden zijn die er in werkelijkheid waarschijnlijk niet is.

In studies naar de prevalentie van verwekkers van CAP is *Streptococcus pneumoniae* de meest voorkomende. *Haemophilus influenzae*, *M. pneumoniae* en *Legionella* spp. bezetten vaak de tweede plaats. Bij een belangrijk deel (30-50%) van de patiënten kan echter, ondanks uitgebreide microbiologische diagnostiek, geen verwekker worden gevonden. In **hoofdstuk 14** beschrijven wij een onderzoek onder 242 gehospitaliseerde CAP-patiënten bij wie de aanwezigheid van respiratoire virussen en *Legionella* spp. in keelwabs met behulp van real-time PCR werd onderzocht. Virale respiratoire pathogenen werden met behulp van serologie bij 7 (2%) patiënten aangetoond, en bij 50 (21%) patiënten met PCR ( $p < 0,0001$ ). In totaal werden met conventionele diagnostiek bij 137 (57%) patiënten één of meerdere verwekkers gevonden, en dit aantal nam toe naar 158 (65%) na het toepassen van de verschillende PCR-

assays ( $p = 0,06$ ). Deze toename was voornamelijk het gevolg van het aantonen van een groot aantal respiratoire virussen, met name influenzavirus, para-influenzavirus en humaan coronavirus. De *L. pneumophila*-PCR was positief bij 3 van de 11 bevestigde legionellosepatiënten (29%).

Deze studie laat zien dat het aantal verwekkers dat men vindt bij patiënten met een CAP, toeneemt van ongeveer de helft naar ongeveer twee derde van de patiënten. Hoewel de detectie van *Legionella* in keelwabs mogelijk is, laten onze resultaten zien dat dit materiaal niet betrouwbaar is voor de detectie van *Legionella* met behulp van PCR.

De moleculaire diagnostiek is een belangrijk onderdeel geworden van de dagelijkse praktijk in de microbiologische ziekenhuislaboratoria. Met name de ontwikkelingen op het gebied van de real-time PCR-technologie hebben nieuwe toepassingen van zowel kwalitatieve en kwantitatieve tests makkelijker en toegankelijker gemaakt. Ondanks dat er vele publicaties voorhanden zijn die de (veelal in-vitro) evaluatie van nieuwe PCR-assays voor de detectie van *Legionella* spp. beschrijven, weten we echter nog niet precies wat nu de waarde (of meerwaarde) is van deze techniek voor een routinelaboratorium. Met andere woorden: zijn deze PCR-tests daadwerkelijk een verbetering c.q. aanvulling ten opzichte van de klassieke technieken? In het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid in Tilburg wordt al jaren een combinatie van klassieke technieken (kweek, urineantigeentest en serologie) en PCR voor de detectie van *Legionella* spp. uitgevoerd. **Hoofdstuk 15** beschrijft een vergelijking tussen de resultaten verkregen met klassieke technieken en PCR. Voor het aantonen van *Legionella* werden gedurende de onderzochte periode twee assays gebruikt met targets op genen coderend voor het 16S rRNA-gen en het *mip*-gen. We wilden twee vragen beantwoorden.

Ten eerste, hoe is de gevoeligheid en specificiteit van PCR in vergelijking met de conventionele diagnostiek? De sensitiviteit en specificiteit werden geschat op respectievelijk 83% en 93% voor de 16S rRNA PCR, en 88% en 98% voor de *mip*-gen PCR. Acht potentieel fout-positieve resultaten werden gevonden in 16S rRNA PCR, en 2 potentieel fout-positieve resultaten in de *mip*-gen PCR. Omdat de gevoeligheid van de conventionele diagnostiek nooit 100% is, vermoeden we dat een deel van de fout-positieve resultaten in werkelijkheid waar-positief zijn, vanwege de (wellicht) hogere gevoeligheid van PCR. Dit zou betekenen dat de specificiteit in werkelijkheid hoger is dan nu gevonden. Daarom werd een discrepantieanalyse verricht waarbij discrepante resultaten (PCR positief, conventioneel negatief) bevestigd werden met PCR (herhaling, andere assays) of sekwentieanalyse (waar-positief) of juist niet (fout-positief). Van de negen patiënten met discrepante resultaten werd bij twee patiënten een infectie met *L. pneumophila*, en bij één patiënt een *Legionella non-pneumophila* spp.-infectie bevestigd. De overige 6 positieve resultaten werden beschouwd als fout-positief. Met deze gecorrigeerde resultaten, en uitgaand van een prevalentie van *Legionella* spp. bij patiënten met CAP van 5%, werden een sensitiviteit, specificiteit, positief voorspellende en negatief voorspellende waarde van 82%, 95%, 44% en 99% voor 16S rRNA PCR, en 86%, 100%, 100% en 99%, voor de *mip*-gen PCR gevonden.

Het tweede doel van de studie was om na te gaan of *Legionella*-specifieke PCR een meerwaarde heeft voor de diagnose legionellose ten opzichte van de urineantigeentest. Met andere woorden, leidt de introductie van een nieuwe extra test tot een toename van het aantal diagnoses? 139 patiënten waren zowel met PCR als met de urineantigeentest onderzocht. Met de urineantigeentest werden 35 patiënten gediagnosticeerd, evenveel als met 16S rRNA PCR (na discrepantieanalyse). De specificiteit van 16S rRNA PCR is echter te laag (95%). Een positief resultaat zou daarom altijd eerst bevestigd moeten worden met een andere PCR-assay of een geheel andere techniek alvorens een betrouwbare uitslag mag worden afgegeven. Een echt snelle diagnose lijkt daarom met deze assay moeilijk haalbaar. Hoewel de *mip*-gen PCR meer legionellosepatiënten detecteerde (37 versus 35 patiënten), was dit verschil niet



statistisch significant. De combinatie van een urineantigeentest en een *mip*-gen PCR detecteerde echter in totaal 40 patiënten. Hoewel dit verschil niet significant is, denken wij dat de *mip*-gen PCR kan zorgen voor een relevante toename van het aantal diagnoses van patiënten met legionellose. Dit zou echter idealiter in een prospectief vergelijkende studie moeten worden bevestigd.